3 cm

3 cm

ตัวอย่างการเขียนเรื่องเต็ม

ชื่อเรื่อง: Cordia New 16 pt, จัดกึ่งกลาง ตัวใหญ่และหนา

การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาคัพภะหวายในสภาพเย็นยิ่งยวด

OPTIMIZATION OF CRYOPRESERVATION TECHNIQUE OF RATTAN'S EMBRYO

ชื่อผู้แต่ง: Cordia New 14 pt จัดกึ่งกลาง ตัวปกติ

กำไล เรียนหัตถกรรม[1], สนธิชัย จันทร์เปรม[2], ภาณี ทองพำนัก[3],
ศิริกุล เกษา[1], ปิยรัษฎ์ เจริญทรัพย์[1] และพรชัย จุฑามาศ[1]

Kamlai Reanhatthakam[1], Sontichai Chanprame[2], Panie Tongpamnak[3],
Sirikool Kesa[1], Piyarat Chareonsap[1] and Pornchai Jutamas[1]

ที่อยู่: Cordia New 12 pt จัดชิดซ้าย ตัวเอียง

[1]โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สวนจิตรลดา เขตดุสิต กทม. 10303, [2]ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140, [3]ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 7 สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[1]Plant Genetic Conservation Project, Chitralada Villa, Dusit, Bangkok 10303, [2]Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 7314, [3]Central Laboratory and Greenhouse Complex, Research and Development Institute Kasetsart University Kamphangsaen Nakhon Pathom 73140

หัวข้อบทคัดย่อ: Cordia New, 14 pt, ชิดซ้าย

บทคัดย่อ

เนื้อหาบทคัดย่อ: Cordia New, 14 pt, จัดเท่ากันทั้งสองด้าน ตัวปกติ

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ได้เก็บรวบรวมหวายที่มีคุณค่าใน *in vitro* และ *ex situ* และการเก็บรักษาพันธุกรรมที่นานที่สุด คือการเก็บในสภาพเย็นยิ่งยวด จึงศึกษาการเก็บรักษาคัพภะหวาย 3 ชนิด ซึ่งเป็นตัวอย่างทดลองจากหวายชนิดในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อพ.สธ. สวนจิตรลดา ได้แก่ หวายน้ำผึ้ง หวายกำพวนเล็ก และหวายขี้ไก่ ในไนโตรเจนเหลว 3 วิธีการ คือ vitrification-dehydration, encapsulation-dehydration และ encapsulation- vitrification ก่อนการเก็บรักษาคัพภะจะต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมความพร้อม และเติมสารป้องกันความเย็นที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าคัพภะของหวายทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการเตรียมความพร้อมแต่ไม่แช่ไนโตรเจนเหลว มีการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 3 วิธีการ ส่วนคัพภะของหวายทั้ง 3 ชนิด ที่แช่ไนโตรเจนเหลวโดยวิธี vitrification-dehydrationและวิธี encapsulation-vitrification ไม่พบการรอดชีวิต ส่วนวิธี encapsulation-dehydration พบการรอดชีวิตของคัพภะของหวายหวายน้ำผึ้ง หวายกำพวนเล็ก และหวายขี้ไก่ เป็น 20, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเตรียมความพร้อมของคัพภะทำโดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร preculture เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation แล้วแช่คัพภะใน loading solution สารป้องกันความเย็นที่มี 2 M glycerol + 0.4 M sucrose เป็นเวลา 0, 20 และ 30 นาที จากนั้นวาง bead บน silica gel ปริมาณ 50 กรัมต่อคัพภะ 20 ชิ้น เป็นเวลานาน 14 และ 21 ชั่วโมง เพื่อลดปริมาณน้ำในเซลล์ก่อนนำไปแช่ไนโตรเจนเหลว วิธีการที่ให้ผลดีที่สุด คือ แช่สาร loading solution 30 นาที และลดปริมาณน้ำด้วย silica gel 14 ชั่วโมง ก่อนนำไปแช่ไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาละลายน้ำแข็ง และนำไปเลี้ยงบนอาหาร preculture 1 วัน หลังจากนั้นแคะเอาเฉพาะส่วนคัพภะย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน คัพภะสามารถรอดชีวิตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในหวายขี้ไก่

หัวข้อบทคัดย่อ: Cordia New, 14 pt, ชิดซ้าย ตัวหนา

ตัวอย่างการเขียนเรื่องเต็ม

เนื้อหาบทคัดย่อ: Cordia New, 14 pt, จัดเท่ากันทั้งสองด้าน ตัวปกติ

Abstract

Plant Genetic Conservation Project under the Royal Intiative of Her Royal Htighness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG) has collected valuable rattan species and preserved then using *in vitro* and *ex situ* methods. Cryopreservation technique can preserve genetic resources for the longest period of time and this technique is used to determined preservation of 3 rattan species; *Calamus* sp., *Calamus longisetus* Griff., *Calamus myrianthus* Becc. Which are the rattan cultured at tissue culture laboratory, RSPG. in liquid nitrogen was studied using vitrification-dehydration, encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification . The preculturing and the cryoprotectant immersion duration were also experimented in order to study the most suitable condition for this method. The survival rate of embryos before liquid nitrogen immersion was 100% and after liquid nitrogen immersion was 20, 80 and 100% in *Calamus* sp., *C. longisetus* Griff., *C. myrianthus* Becc, respectively. The most suitable method was to preculture the embryos on precultured medium for seven days. The embryos were then encapsulated and left in loading solution containing 2M glycerol and 0.4M sucrose for 0,20 and 30 minutes. The encapsulated embryos were then dehydrated using silica gel (20embryos per 50 g silica gel) for 14 and 21 hours. After that the encapsulated embryos were plunged into liquid nitrogen. After thawing and reculturing on preculture medium for 1 days, the embryos were taken out from supported medium and transferred onto MS medium . They were then incubated for 1 month and it was found that survival rate of embryos was 100% in *C. myrianthus Becc.*

คำสำคัญและติดต่อนักวิจัย: Cordia New, 12 pt., จัดชิดซ้าย ตัวปกติ

คำสำคัญ : การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว, หวาย, encapsulation-dehydration

Keywords: cryopreservation, rattan, encapsulation-dehydration

*ติดต่อนักวิจัย : กำไล เรียนหัตถกรรม (อีเมล์ kamlai@rspg.org)

*Corresponding author: Kamlai Reanhatthakam (Email: kamlai@rspg.org)

หัวเรื่องเช่น บทนำ วิธีการทดลอง ให้ใช้ Cordia New, 14 pt., จัดชิด

บทนำ

หวายเป็นพืชวงศ์ Palmae เป็นเถาเลื้อยลำต้นปีนป่ายตามต้นไม้ มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบโลกเก่า (Old World tropics) และเขตกึ่งร้อน ในโลกมีหวายทั้งหมด 13 สกุล 600 ชนิด (Zehui, 2007) ในประเทศไทยพบ 6 สกุล 62 ชนิด คือ สกุล *Calamus*, *Daemonorops*, *Korthalsia*, *Plectocomia*, *Plectocomiopsis* และ *Myrialepsis* (Sutthisrisilapa, 2004) พบมากบริเวณป่าดิบชื้นทางภาคใต้ของประเทศ หวายเป็นผลผลิตที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ได้มาจากป่า สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการทำเครื่องจักสาน ส่วนใหญ่ใช้ทำเฟอร์นิเจอร์ เพื่อส่งออกและใช้ภายในประเทศ ปัจจุบันประเทศประสบกับภาวะการขาดแคลนวัตถุดิบหวายเพื่อใช้ทำฟอร์นิเจอร์ เนื่องจากหวายหลายชนิดที่มีคุณภาพดีถูกตัดออกมาใช้กันอย่างไม่มีการควบคุมและขาดการอนุรักษ์ พื้นที่ป่าถูกทำลาย ทำให้หวายหลายชนิดเกือบสูญพันธุ์ไป อีกทั้งยังมีข้อจำกัดเรื่องการขยายพันธุ์ ในธรรมชาติหวายมีการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดและแตกหน่อ เมล็ดหวายเป็นเมล็ดที่ไม่สามารถเก็บรักษาได้เมื่อเก็บผลมาแล้ว

เนื้อเรื่องใช้Cordia New, 14 pt., จัดหน้าแบบเท่ากันทั้งสองด้านและแบ่งเป็น 2 คอลัมน์

ตัวอย่างการเขียนเรื่องเต็ม

ต้องนำมาปลูกทันทีเพราะถ้าเก็บไว้นานเกิน 1สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์การงอกจะลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการเก็บรักษาเมล็ดระยะยาวนานเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต ซึ่งวิธีการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (Cryopresercation)เป็นการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส(Withers and Engelmann, 1997) ซึ่งในการเก็บรักษาพันธุกรรมในสภาพที่อุณหภูมิต่ำทำให้การแบ่งเซลล์และขบวนการ metabolism ต่าง ๆ ภายในเซลล์หยุดการทำงาน ทำให้สามารถเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชไว้ได้นาน (Engelmann, 2004) การเก็บรักษาพันธุกรรมด้วยวิธีนี้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถเก็บรักษาพันธุกรรมได้เกือบทุกชิ้นส่วน และสามารถขยายระยะเวลาในการเก็บรักษาไว้ได้ การทำ encapsulation (Hirai *et al*., 1998) วิธีนี้ไม่เป็นพิษต่อพืชและสามารถป้องกันชิ้นส่วนระหว่างการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Niino and Sakai. 1992) พืชที่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้ เช่น shoot tips ของ *Dendrobium* 'Walter Oumae' (Lurswigidjarus and Thammasiri, 2004) protocorm-like bodies ของ *Oncidium* (Miao *et al*., 2005) protocorm ของ *Oncidium bifolium* ในสภาพปลอดเชื้อ (Flachsland *et al*., 2006) และ protocorms ของ *Vanda coerulea* (Jitsopakul *et al*. 2008)

จุดประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาคัภพะหวายในไนโตรเจนเหลวในการอนุรักษ์พันธุกรรมหวายต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ศึกษาการเก็บรักษาคัพภะหวาย 3 ชนิด คือ หวายน้ำผึ้ง หวายกำพวนเล็ก และหวายขี้ไก่ ในไนโตรเจนเหลว 3 วิธีการ คือ vitrification-dehydration, encapsulation-dehydration, encapsulation- Vitrification

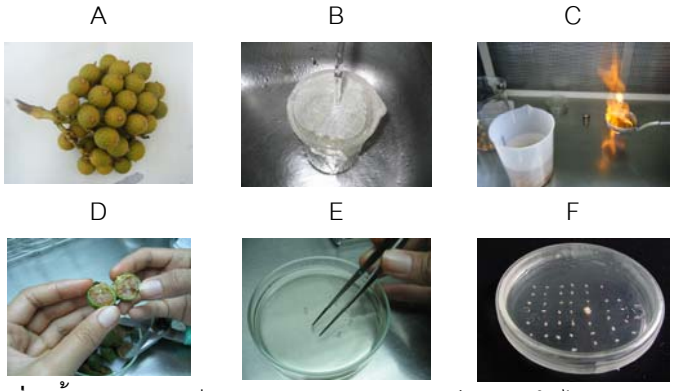
1. การเตรียมคัพภะหวายก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ล้างผลหวายในน้ำไหลนาน 20 นาที แล้วแช่ในสารละลาย Clorox 20% ร่วมกับ Tween 20 2-3 หยด นาน 30 นาที จากนั้นเผาผลด้วยแอลกอฮอล์ 95 % หลังจากนั้นนำเมล็ดมาแคะเอาเฉพาะส่วนของคัพภะมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร preculture (อาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 1)

2. การเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี vitrification-dehydration บรรจุเฉพาะส่วนของคัพภะหวายใส่ใน cryotube แช่ใน loading solution (LS ; 2 M glycerol + 0.4 M sucrose) เป็นเวลา 0, 20 และ 30 นาที แล้วนำไปแช่ในสาร cryoprotectant PVS_2 30% (w/v) glycerol, 15%(w/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 15% (w/v) ethylene glycol ที่เติม 0.4 M sucrose) นำไป prefreezing ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 45, 60 และ 90 นาที แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว (ภาพที่ 2)

3. การเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation-dehydration บรรจุส่วนของคัพภะหวายลงในขวดที่มี 6% Na-alginate ใช้ trip ปลายตัดดูดสารละลาย 6% Na-alginate ให้มีชิ้นส่วนของคัพภะติดมาด้วย หยดลงในขวดที่มี 0.1 M $CaCl_2$ ทิ้งไว้ 30 นาที ย้าย beads ที่เกิดขึ้น แช่ในloading solution (LS) เป็นเวลา 0, 20 และ 30 นาที นำ beads วางบนจานแก้วเพื่อดึงน้ำออกด้วย silica gel 50 กรัม/คัพภะ 20 ชิ้นในจานแก้วปิดฝา เป็นเวลา 0, 14 และ 21 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ beads บรรจุลงใน cryotube แล้วแช่ไนโตรเจนเหลว (ภาพที่ 3)

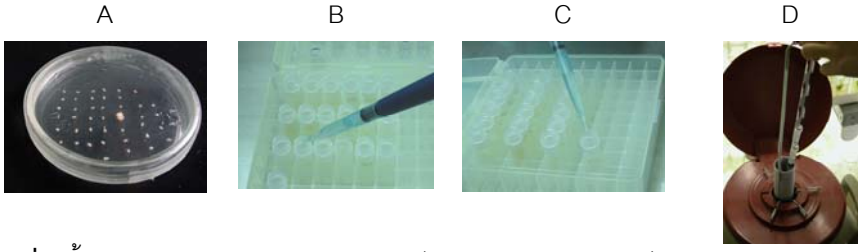
4. การเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-vitrification บรรจุส่วนของคัพภะหวายลงในขวดที่มี 6% Na-alginate ใช้ trip ปลายตัดดูดสารละลาย 6% Na-alginate ให้มีชิ้นส่วนของคัพภะติดมาด้วย หยดลงในขวดที่มี 0.1 M $CaCl_2$ ทิ้งไว้ 30 นาที ย้าย beads แช่ใน loading solution (LS) เป็นเวลา 0, 20 และ 30 นาที เติมสาร PVS2 นำไป prefreezing ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 45, 60 และ 90 นาที นำเม็ด beads ใส่ cryotube และเติม PVS_2 ลงใน cryotube แล้วแช่ไนโตรเจนเหลว (ภาพที่ 4) ในการทดลองการเก็บรักษาคัพภะหวายทั้ง 3 วิธี จะศึกษาอัตราการรอดชีวิตของคัพภะทั้งก่อนและหลังการแช่ไนโตรเจนเหลว โดยทดลองแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

5. ทดสอบการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว นำคัพภะที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว มาละลายน้ำแข็งด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างสาร PVS2 ใน unloading solution (1.2 M sucrose) เป็นเวลา 20 นาที แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหาร preculture (MS+0.3 M sucrose) เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมคัพภะหวายก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

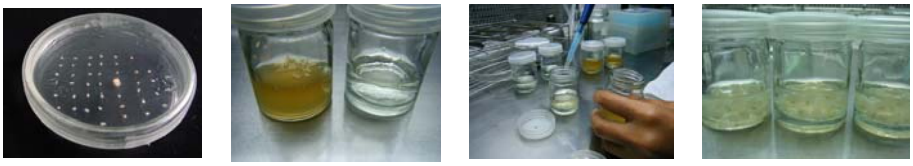
A : ผลหวายสด
B : แช่น้ำไหล นาน 20 นาที
C : เผาผลหวายด้วยแอลกอฮอล์ 95 %
D : แคะคัพภะหวาย
E : คัพภะหวาย
F : เลี้ยงในอาหาร preculture นาน 7 วัน



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี vitrification-dehydration

A : เพาะเลี้ยงในอาหาร preculture นาน 7 วัน
B : เติมสาร loading solution แช่ไว้ตามระยะเวลาต่าง ๆ
C : เติมสาร PVS_2 แช่ไว้ตามระยะเวลาต่าง ๆ
D : เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว

A B C D



E F

ภาพที่ 3 ขั้นตอนการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration

A : เพาะเลี้ยงในอาหาร preculture นาน 7 วัน

B : 6% Na-alginate และ 0.1 M $CaCl_2$

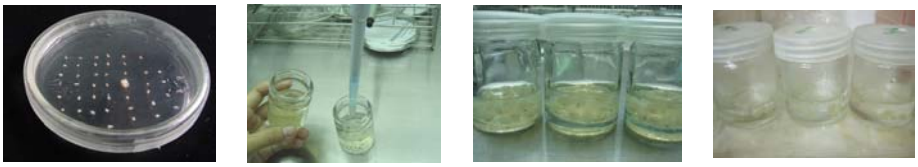
C : ทำ encapsulation ใน 6% Na-alginate

D: แช่ beads ใน loading solution ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

E: วาง beads บน silica gel ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

F: เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว

A B C D



E

ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี Encapsulation-vitrification

A : เพาะเลี้ยงในอาหาร preculture นาน 7 วัน

B : ทำ encapsulation ใน 6% Na-alginate

C : แช่ beads ใน loading solution ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

D : แช่ beads ใน PVS_2 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

E : เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว

A B C D

ภาพที่ 5 ขั้นตอนการเพาะคัพภะหวายให้งอกภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

A : เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว

B : ละลายน้ำแข็งในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37-40 °Cนาน 2 นาที

C : แช่ในสารละลาย 1.2 M sucrose (unloading solution) นาน 20 นาที

D: ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร pegrowth

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี vitrification-dehydration

จากการนำคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร preculture เพื่อเตรียมความพร้อมนาน 7 วัน มาทดสอบหาช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution และระยะเวลาการแช่สาร PVS_2 ที่อุณภูมิ 0 °c พบว่า คัพภะที่ไม่แช่ไนโตรเจนเหลวมีการรอดชีวิตเป็น 100% ทุกการทดลอง สังเกตจากคัพภะมีการขยายตัวใหญ่ขึ้น สีของคัพภะมีสีขาวอมเหลือง (ภาพที่ 6A) และสังเกตได้ว่าการทำ preculture เพื่อกระตุ้นการปรับตัวให้ทดทานต่อสภาพแช่แข็งเพียงอย่างเดียวในเวลา 7 วัน ให้ผลการรอดชีวิตเหมือนกับการเติมสารป้องกันความเย็นทุกช่วงระยะเวลา แสดงว่าสาร cryoprotectants ไม่เป็นพิษต่อคัพภะ (Wang *et. al.*, 2005) ส่วนคัพภะที่แช่ไนโตรเจนเหลวไม่มีการตอบสนองต่ออาหาร MS ลักษณะของคัพภะกลายเป็นสีดำ (ภาพที่ 6B) ทุกการทดลอง อาจเป็นเพราะช่วงเวลาในการแช่สาร Loading solution และ PVS_2 น้อยเกินไป ทำให้สาร cryoprotectants ประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ได้แก่ DMSO และ glycerol ไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ ทำให้การป้องกันการยืดตัวของเซลล์และปกป้องการเปลี่ยนแปลงของระบบ membrane บกพร่อง ส่วนสารประเภทออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ เช่น sucrose ที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์มีประสิทธิภาพลดลงทำให้น้ำภายในเซลล์เปลี่ยนเป็นผลึกน้ำแข็งทิ่มแทงเซลล์จนเสียหาย จึงไม่พบการรอดชีวิตของคัพภะ (Engelmann, 2000; Pennycooke and Towill, 2000)

2. ผลการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration

จากการนำคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร preculture เพื่อเตรียมความพร้อมนาน 7 วัน มาหาช่วงเวลาในการแช่ beads ที่มีคัพภะในสาร loading solution และระยะเวลาในการดึงน้ำออกจากเม็ด beads โดยใช้ silica gel 50 กรัม/คัพภะ 20 ชิ้น พบว่า คัพภะที่ไม่แช่ไนโตรเนเหลวมีการรอดชีวิตเป็น 100% สังเกตจากคัพภะมีสีขาวอมเหลือง และขนาดใหญ่ (ภาพที่ 6C) ทุกการทดลองแสดงว่า ระยะเวลาในการแช่สาร loading solution 0, 20 และ 30 นาที และการใช้ silica gel ที่ 14 และ 21 ชั่วโมง ไม่ทำให้คัพภะได้รับความเสียหาย ส่วนคัพภะที่แช่ไนโตรเจนเหลวมีการตอบสนองต่ออาหาร MS สังเกตจากคัพภะมีสีขาวอมเหลือง พร้อมที่จะพัฒนา

(ภาพที่ 6D) การรอดชีวิตของหวายทั้ง 3 ชนิด แตกต่างกันคือ หวายขี้ไก่รอดชีวิต 100% จากการแช่สาร loading solution 30 นาที ร่วมกับการใช้ silica gel ที่ 14 ชั่วโมง หวายกำพวนเล็กรอดชีวิต 80% จากการแช่สาร loading solution 0 นาที ร่วมกับการใช้ silica gel ที่ 14 ชั่วโมง และหวายน้ำผึ้งรอดชีวิต 20% จากการแช่สาร loading solution 20 นาที ร่วมกับการใช้ silica gel ที่ 14 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) เป็นผลจากการเตรียมความพร้อมของคัพภะบนอาหาร preculture ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงถึง 0.4 M นาน 7 วัน ก่อนการทำเม็ด beads ช่วยทำให้เซลล์เกิดการสะสมน้ำตาลและเพิ่มความเสถียรของผนังเซลล์มากขึ้น โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครสสามารถปกป้องเซลล์จากความเย็นในขณะที่เซลล์สูญเสียน้ำ การใช้ silica gel ที่ 14 ชั่วโมง ดึงน้ำออก สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่บริเวณ intracellular ของเซลล์ (Uragami *et. al.*, 1990) และการดึงน้ำออกจากเม็ด beads ด้วยสาร loading solution ที่มี glycerol สามารถทำให้เนื้อเยื่อทนต่อความเย็นได้ดีขึ้น

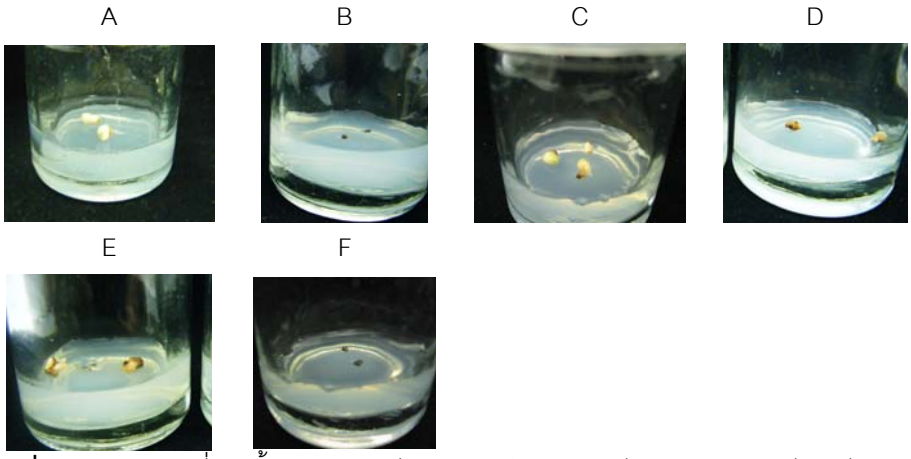
ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ผ่านขั้นตอนการปรับสภาพโดยวิธี encapsulation-dehydration เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน

Silica gel (ชั่วโมง)	แช่ LS (นาที)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต					
		หวายน้ำผึ้ง		หวายกำพวนเล็ก		หวายขี้ไก่	
		แช่ LN	ไม่แช่ LN	แช่ LN	ไม่แช่ LN	แช่ LN	ไม่แช่ LN
14	0	0%	100%	**80%**	100%	20%	100%
	20	**20%**	100%	60%	100%	40%	100%
	30	0%	100%	40%	100%	**100%**	100%
21	0	20%	100%	20%	100%	40%	100%
	20	0%	100%	40%	100%	80%	100%
	30	0%	100%	0%	100%	80%	100%

3) ผลการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-vitrification

จากนำคัพภะหวายที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร preculture เพื่อเตรียมความพร้อมเป็นเวลา 7 วัน มาหาช่วงเวลาในการแช่ beads ที่มีคัพภะในสาร loading solution และระยะเวลาในการแช่ beads ใน PVS_2 ที่อุณภูมิ 0 °c พบว่า คัพภะที่ไม่แช่ไนโตรเจนหลว มีการรอดชีวิต 100% ลักษณะของคัพภะมีสีขาวอมเหลือง (ภาพที่ 6E) พร้อมที่จะพัฒนาต่อไป ส่วนคัพภะที่แช่ไนโตรเจนเหลว ไม่มีการตอบสนองต่ออาหาร MS สังเกตได้จากสีคัพภะกลายเป็นสีดำ (ภาพที่ 6F) ทุกการทดลอง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน อาจเป็นเพราะระยะเวลาการแช่สาร loading solution และ PVS_2 น้อยเกินไป ทำให้ไม่สามารถดึงน้ำออกจากเซลล์ได้ จึงเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายและเสียหายได้

ตัวอย่างการเขียนเรื่องเต็ม



ภาพที่ 6 คัพภะหวายที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมความพร้อมก่อนนำไปแช่และหลังนำไปแช่ไนโตรเจนเหลว ทั้ง 3 วิธีการ เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน

A : การพัฒนาของคัพภะที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว วิธี vitrification-dehydration

B: คัพภะที่ไม่สามารถรอดชีวิตได้ภายหลังการแช่ไนโตรเจนเหลว วิธี vitrification-dehydration

C: การพัฒนาของคัพภะที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว วิธี encapsulation-dehydration

D: การพัฒนาของคัพภะภายหลังการแช่ไนโตรเจนเหลว วิธี encapsulation-dehydration

E: การพัฒนาของคัพภะที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว วิธี encapsulation-vitrification

F: คัพภะที่ไม่สามารถรอดชีวิตได้ภายหลังแช่ไนโตรเจนเหลว วิธี encapsulation-vitrification

สรุปผลการทดลอง

การเก็บรักษาคัพภะหวายน้ำผึ้ง หวายกำพวนเล็ก และหวายขี้ไก่ ในไนโตรเจนเหลว ทั้ง 3 วิธีการ คือ vitrification-dehydration, encapsulation-dehydration และ encapsulation-vitrification พบว่าวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาทำได้โดยการปรับสภาพคัพภะด้วยการทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation และแช่ใน loading solution เป็นเวลา 0, 20 หรือ 30 นาที ตามด้วยการทำให้แห้งด้วย silica gel ที่ 50 กรัม/คัพภะ 20 ชิ้น เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เพื่อลดปริมาณน้ำในเซลล์ แล้วจึงนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 วัน เมื่อนำมาทดสอบการรอดชีวิต โดยผ่านขั้นตอนการละลายน้ำแข็งและนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน พบการรอดชีวิตของคัพภะหวาย นอกจากนี้จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการแช่ loading solution และ ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย silica gel แล้วยังขึ้นอยู่กับชนิดของหวายและขนาดของคัพภะที่นำมาเก็บรักษาด้วย ซึ่งในขั้นต่อไปจะหาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาคัพภะหวายแต่ละชนิดโดยวิธี encapsulation-dehydration ต่อไป

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ตัวอย่างการเขียนเรื่องเต็ม

เอกสารอ้างอิง

Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic Resources, pp. 1-7. *In* Englemann, F. and Takagi, H. (eds.), **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm Current Research Progress and Application** : IPGRI.

Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. ***In vitro*** **Cell Biol Plant**. 40: 427-433 .

Flachsland, E., G. Terada., A. Scocchi., H. Rey., L. Mroginski and F. Engelmann. 2006. Cryopreservation of seeds and *in vitro*-cultured proticorm of *Oncidium bifolium* (orchidaceae) by encapsulation-dehydration . **CryoLetters 27**: 235-242.

Hirai D., K. Shirai. S. Shirai and A. Sakai. 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. **Euohytica 101**: 109-115.

Jitsopakul, N., K. Thammasiri and K. Ishikawa. 2008. Cryopreservation of *Vanda coerulea* protocorms by encapsulation-dehydration. **Cryoletters 29**: 253-260

Lurswigidgarus W. and K. Thammasiri. 2004. Cryopreservation of shootips of *Dendrobium* Walter Oumae by encapsulation-dehydration. **ScienceAsia 30**: 293-299.

Miao, N. Hwey., Y. Kaneko and Y. Sugawara. 2005. Ultrastructural implications of pretreatment for successful cryopreservation of *Oncidium* protocorm-like body. **CryoLetters 26**: 333-340.

Niino, T. and A. Sakai.1992. Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. **Plant Sci. 87**; 199-206.

Pennycooke, J. C. and Towill, L.E. 2000. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by vitrification. **Plant Cell Rep**. 19: 733-737.

Sutthisrisilapa, C. 2004. Country report on the status of rattan resources and uses in Thailand, pp.224-250. *In*: **Regoinal Conference on Sustainable Development of Rattan in Asia**, January 22-23, 2004, Manila, Philippines.

Uragami, A., A. Sakai. and M. Nagai. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparaiplis oflcinalis* L grown *in vitro*. **Plant Cell Rep. 9**: 328-331.

Withers, L. and F. Engelmann. 1997. *In vitro* conservation of plant genetic resources, pp.57-88. *In*: Altman A (ed) **Agricultural Biotechnology**. Marcel Dekker, Inc., New York.

Wang, Q. and Laamanen, J. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Cell Rep**. 24: 280-288

Zehui, J. 2007. Rattan resources and its industry, pp. 261-276. *In*: **Bomboo and Rattan in the World**.